

# Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação

## Total lipids and fatty acids in nutritional label information of packed foods: aspects on legislation and quantification

RIALA6/1205

Sabria AUED-PIMENTEL<sup>1\*</sup>, Odair ZENEON<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Cromatografia, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brasil, e-mail: spimente@ial.sp.gov.br

<sup>1</sup>Laboratório de Cromatografia, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido: 21.01.2009 – Aceito para publicação: 03.08.2009

### RESUMO

A ingestão excessiva de ácidos graxos saturados e *trans* na dieta tem sido correlacionada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares. No Brasil, conforme a Resolução RDC 360/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é exigida a declaração do teor de gordura total (GT) ou lipídios, ácidos graxos saturados (AGS) e *trans* (AGT) na rotulagem dos alimentos embalados, entre outros nutrientes, como estratégia de prevenção das doenças crônicas. Cabe aos laboratórios oficiais verificarem os teores declarados por meio da análise. No entanto, não estão uniformizadas as definições quanto aos componentes lipídicos, tão pouco quanto aos métodos analíticos a serem adotados, inclusive nos laboratórios brasileiros. Considerando-se as exigências legais, a diversidade dos métodos analíticos disponíveis e, principalmente, o direito do consumidor de obter informações confiáveis, a presente revisão teve como objetivo abordar aspectos sobre a legislação de rotulagem nutricional obrigatória dos alimentos, bem como sobre as etapas críticas dos métodos analíticos de quantificação dos componentes lipídicos. Estas etapas podem levar a divergências significativas nos teores obtidos para os nutrientes. Reforçam-se as evidências da necessidade de padronização das metodologias nos laboratórios brasileiros. Tal padronização contribuirá para garantir o direito do consumidor em obter informações uniformes e exatas sobre os alimentos que adquire, e possibilitará a escolha dos mais saudáveis, além de favorecer a inserção dos produtos brasileiros no mercado internacional.

**Palavras-chave.** lipídios, ácidos graxos, métodos/determinação, rotulagem nutricional, legislação.

### ABSTRACT

The excessive ingestion of saturated and *trans* fatty acids on a diet has been associated with an increased risk of getting cardiovascular diseases. In Brazil, the Federal Directive RDC 360/03 of the National Agency for Sanitary Surveillance (ANVISA) demands the declaration of the contents of total fat (TF) or total lipid (TL), saturated fatty acid (SFT) and *trans* fatty acid (TFA), among other nutrients, on the labels of packed foods as an strategy to prevent chronic diseases. One of the attributions of official laboratories is to certify the stated nutritional contents on food package labels by means of analytical investigation. However, definitions about lipidic components of foods, as well as the analytical methods to be used in their determination, have not been uniformed yet. Considering the legal requirements, the diversity of available analytical methods, and mainly to the rights of customers to obtain reliable information, the present review aims to discuss aspects of the legislation on obligatory nutritional food labeling and the critical steps of analytical methods employed to quantify the lipidic components. These methods may lead to significant divergence on the values of contents of such nutrients. Emphasis is made on evidences of the need for standardization of methodologies for this specific purpose at Brazilian laboratories. This strategy surely will contribute to guarantee the rights of customers to receive uniform and exact information on available foods, so they are able to choose those considered healthier and to facilitate the insertion of Brazilian food products into the international trade.

**Key words.** lipids, fatty acids, determination/methods, nutritional labeling, legislation.

## INTRODUÇÃO

A legislação brasileira exige a declaração nos rótulos dos alimentos embalados de alguns nutrientes, como a gordura total (GT), ácidos graxos (AG) saturados e *trans*. Esta é uma das estratégias da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do Ministério da Saúde brasileiro para prevenir as doenças crônicas.<sup>1,2,3,4</sup> As abordagens e legislações sobre rotulagem nutricional dos alimentos são temas novos. Não estão uniformizados as definições e os métodos analíticos para aqueles componentes, inclusive nos laboratórios brasileiros. Quanto à determinação de gordura total, pela definição da legislação brasileira, diferentes métodos gravimétricos podem ser aplicados. Os valores de GT e, conseqüentemente dos AG, estarão sujeitos a variações do método analítico.

Nos Estados Unidos e Canadá, por outro lado, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.06, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)<sup>5,6,7</sup>.

Considerando as exigências da legislação, a diversidade dos métodos analíticos, a globalização dos mercados e, principalmente, o direito do consumidor de informações precisas para a escolha de uma alimentação saudável, a presente revisão teve como objetivo abordar aspectos sobre a legislação de rotulagem nutricional obrigatória dos alimentos e as etapas críticas dos métodos analíticos de quantificação dos componentes lipídicos para fins daquela informação, as quais podem gerar discrepâncias nos resultados.

### ■ Os lipídios dos alimentos: fatores de risco para as doenças cardiovasculares

Os lipídios da dieta, quando consumidos com moderação, são importantes para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde. O avanço das pesquisas tem demonstrado o enorme potencial biológico destas moléculas<sup>8</sup>. Os ácidos graxos (AG), constituintes principais dos lipídios das dietas, podem modular a função de vários sistemas e reduzir ou favorecer a ocorrência de diversas doenças<sup>9,10</sup>. A ingestão inadequada de certos componentes, como os ácidos graxos saturados e os insaturados *trans*, tem sido correlacionada ao aumento no risco de doenças cardiovasculares, que é a principal causa de mortalidade no mundo<sup>4,11,12,13</sup>.

A partir de meados do século XX, o mundo tem sofrido mudanças que se refletem nos hábitos alimentares, a princípio nos países desenvolvidos e, mais recentemente, naqueles em desenvolvimento. As dietas tradicionais baseadas principalmente em alimentos de origem vegetal foram substituídas por dietas com alto teor de gordura e, portanto, mais calóricas. Em resposta a estas mudanças houve um aumento das enfermidades crônicas e os principais fatores de risco estão relacionados à dieta e à atividade física<sup>4,12</sup>.

Estudos realizados na década de 90 mostram que nos países do ocidente a gordura consumida diariamente correspondia de 35 a 45% da energia total da dieta (80 a 150 g/dia); os ácidos graxos saturados contribuíam com cerca de 13% (30 g/dia) e os *trans* de 1,0 a 2,5% (2,5-5,5 g/dia)<sup>13,14</sup>. Entretanto, as recomendações da OMS é que a gordura total da dieta não exceda a 30% da energia, os AGS não passem de 10% e os *trans* contribuam com menos que 1% desta energia (até 2 g por dia)<sup>2,4</sup>.

### ■ A informação nutricional como estratégia de prevenção das doenças crônicas

As doenças crônicas oneram o sistema de saúde e atingem uma grande parte da população economicamente ativa. Em função disto, os países membros da OMS têm interesse de adotar políticas eficazes e sustentáveis para prevenir estas enfermidades. As informações nutricionais na rotulagem têm facilitado aos consumidores conhecerem as propriedades nutricionais dos alimentos sendo uma estratégia da Organização Mundial de Saúde no combate às doenças crônicas<sup>3</sup>.

A Comissão do *Codex Alimentarius*, criada em 1962 pela OMS, tem como objetivos estabelecer padrões para os alimentos, protegendo assim a saúde do consumidor e incentivando práticas justas no comércio internacional. Esta comissão recomenda que a declaração dos nutrientes na rotulagem seja voluntária. A declaração obrigatória deve ser feita para aqueles alimentos cujos rótulos apresentem alguma alusão ou apelo nutricional e alimentos para fins especiais. Diversos países têm adotado esta orientação, principalmente os da Europa. Outros países, considerando a condição de saúde de sua população, têm adotado a rotulagem obrigatória, sendo que este grupo tem aumentado<sup>2</sup>.

As legislações em diversos países do mundo têm exigido maior detalhamento na rotulagem dos alimentos sobre determinados grupos de ácidos graxos, como por exemplo, os ácidos graxos saturados e *trans*, os quais estão

relacionados com o risco de doenças cardiovasculares, além do nível de ácidos graxos essenciais<sup>1,4,15,16,17, 18</sup>.

Israel e os Estados Unidos, em 1993, foram os primeiros países a exigirem a declaração de nutrientes na rotulagem dos alimentos embalados. Esta exigência entrou em vigor no Brasil a partir de setembro de 2001<sup>16</sup>. Outros países como Nova Zelândia, Canadá e Malásia adotaram a declaração obrigatória sendo que a partir de 2006 tal exigência foi estendida aos países do Mercosul, além do Brasil<sup>2,19</sup>.

Com relação à declaração de ácidos graxos *trans*, esta passou a ser obrigatória nos Estados Unidos desde julho de 2003 e a partir de dezembro do mesmo ano, no Brasil e países do Mercosul<sup>1,5</sup>. Na Dinamarca, em 2004, foi estabelecida uma legislação limitando a 2% os níveis de AGT, obtidos por processos industriais, nos alimentos comercializados naquele país<sup>20</sup>. Em 2005, na cidade de Nova York, Estados Unidos, o Departamento de Saúde e Higiene Mental passou a exigir dos restaurantes e fornecedores de alimentos que eliminassem de suas cozinhas as gorduras vegetais parcialmente hidrogenadas (GVPH), principais fontes de AGT provenientes de processo industrial, visando produzir alimentos livres destes ácidos graxos<sup>12</sup>.

#### ■ **Legislação brasileira sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados**

A política de Alimentação e Nutrição do Ministério da Saúde (MS) brasileiro, em sintonia com os objetivos da OMS, é voltada para a redução da prevalência das doenças nutricionais e orientação para o consumo de alimentos saudáveis. A partir de 2001 passou a vigorar a resolução RDC 40/01 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde Brasileiro, com exigências de declarações de rotulagem nutricional<sup>16</sup>. Esta foi substituída pela RDC nº 360/03, que é uma legislação harmonizada entre os países do Mercosul. Nela consta a exigência da declaração de valor energético e teores de carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras *trans*, fibra alimentar e sódio. Empresas de alimentos, brasileiras e do Mercosul, tiveram como prazo até 31 de julho de 2006 para se adequarem<sup>19</sup>.

Abaixo são relacionados alguns pontos importantes que foram estabelecidos pela legislação em vigor:

- A obrigatoriedade da Informação Nutricional do valor energético (Kcal e KJ), carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras *trans*, fibra alimentar e sódio.

- A padronização dos rótulos para facilitar a leitura e o entendimento das informações pelo consumidor.
- Tolerância:
  1. É admitida uma tolerância de 20% com relação aos valores de nutrientes declarados no rótulo.
  2. Para os produtos que contenham micronutrientes em quantidade superior a tolerância estabelecida no item anterior, a empresa responsável deve manter a disposição os estudos que justifiquem tal variação.
- A informação Nutricional deve ser apresentada na porção e em medidas caseiras. Pela legislação em vigor não é obrigatória a declaração em 100 g ou 100 mL do produto.
- Todas as informações contidas nos rótulos dos alimentos devem ser apresentadas em porções.
- Porção é a quantidade média do alimento que deveria ser consumida por pessoas saudáveis, maiores de 36 meses de idade em cada ocasião de consumo, com a finalidade de promover uma alimentação saudável. Esta definição consta na RDC 359/03 da Anvisa/MS que apresenta o Regulamento Técnico de Porções de Alimentos para fins de Rotulagem Nutricional<sup>17</sup>.

A tolerância de 20 % estabelecida para o valor declarado no rótulo é ainda um ponto que merece discussão e maior clareza na definição, considerando principalmente os teores dos nutrientes. No regulamento técnico dos Estados Unidos, sobre informação nutricional, é prevista também uma tolerância de variação até 20% (para mais) com relação à declaração no rótulo de gordura total e gordura saturada. Entretanto, é enfatizado que nenhuma ação administrativa será fundamentada em resultados superiores àquela margem, quando é reconhecida uma variabilidade superior para os nutrientes, pelos métodos analíticos usuais, no nível de concentração considerado. Com relação aos ácidos graxos mono (AGM) e poli-insaturados (AGP) o teor do nutriente deve ser pelo menos igual a 80% do valor declarado no rótulo<sup>18</sup>.

Pela legislação brasileira em vigor, os teores de ácidos graxos saturados e *trans* podem ser declarados como zero, quando presentes no alimento em quantidade menor ou igual a 0,2 g na porção. Para gordura total, o teor é considerado não significativo, ou zero, quando menor ou igual a 0,5 g na porção do alimento e nenhum outro tipo de gordura seja declarado com quantidades superiores a zero<sup>1</sup>.

Quanto aos ácidos graxos monoinsaturados ou poli-insaturados e o teor de colesterol, a declaração na rotulagem dos alimentos tem caráter opcional segundo

a Portaria 27/98, da ANVISA/MS, a qual dispõe sobre a informação nutricional complementar, entretanto, quando são apresentados apelos na embalagem, relativos à presença destes nutrientes no alimento, a declaração na rotulagem é obrigatória. Alegações para ácidos graxos *trans* tais como: “zero *trans*”, “livre de *trans*” e outras, previstas na Portaria nº 27/98 podem ser utilizadas desde que o alimento pronto para o consumo atenda às seguintes condições: máximo de 0,2 g de gordura *trans* por porção<sup>15</sup>. Como uma recomendação complementar da ANVISA o alimento deve conter também no máximo 2 g de gordura saturada por porção<sup>21</sup>. Aos laboratórios brasileiros credenciados cabe, por meio da análise, verificar tais teores declarados.

Cabe também ressaltar, que a não obrigatoriedade da declaração do nutriente em 100 g do produto pode induzir o consumidor a engano, pois muitas vezes a quantidade consumida é maior que a porção sugerida, acarretando uma ingestão significativa de AGT.

#### ■ **Determinação de gordura total (GT) e ácidos graxos (AG) nos alimentos**

Um dos objetivos da determinação de GT (ou lipídios) e da composição de AG nos alimentos é gerar dados para a informação nutricional. Dependendo da legislação sobre rotulagem nutricional em vigor em cada país, teremos diferentes definições para a GT que deve constar na rotulagem nutricional dos alimentos.

Na legislação Brasileira a gordura total (GT), para fins de rotulagem nutricional, é definida como o conjunto de substâncias de origem vegetal ou animal, formada de triacilglicerol (TAG) e pequenas quantidades de não glicerídios, principalmente fosfolipídios<sup>1</sup>. Já pelas legislações dos Estados Unidos e Canadá, a GT é a soma dos ácidos graxos (AG) das diferentes classes de lipídios expressa como TAG. Esta definição limita o que é considerado gordura para fins de rotulagem nutricional<sup>18</sup>. Os ácidos graxos saturados (AGS), mono, poli-insaturados e *trans* (AGT) devem ser expressos como ácidos graxos livres, de acordo com as três legislações.

A legislação brasileira não especifica metodologias analíticas para a determinação de GT e de AG que farão parte da informação nutricional. A técnica de cromatografia em fase gasosa é a recomendada para a análise de rotina de ácidos graxos<sup>22</sup>. Quanto à determinação de gordura total, pela definição da legislação brasileira, diferentes metodologias podem ser aplicadas<sup>23,24,25</sup>. Portanto a determinação da GT e, conseqüentemente, dos AG estará

sujeita a variações que dependerão da metodologia analítica. Trabalhos atuais têm reforçado esta premissa. Aued-Pimentel e colaboradores<sup>26</sup> em um estudo realizado com amostras de alimentos de referência (leite, ovo, bolacha de chocolate, pudim de baunilha), evidenciaram diferenças significativas quanto aos teores de GT, AGS, AGP e AGT quando aplicados diferentes procedimentos analíticos. Kus, Aued-Pimentel e Mancini-Filho (2009)<sup>27</sup>, em outro estudo realizado com fórmula infantil, também mostraram que o método de extração de lipídios influenciou de maneira significativa na quantificação final dos lipídios totais e ácidos graxos poli-insaturados naquele produto.

Lobanco e colaboradores (2009)<sup>28</sup> avaliando 153 alimentos industrializados, comercializados no município de São Paulo (SP) entre os anos de 2001 e 2005, observaram grande porcentagem de inconformidades relativa ao conteúdo de gordura saturada obtido em laboratório e o declarado pelo fabricante na rotulagem. Os autores apontam como um dos fatores que, provavelmente, contribuíram para tal discrepância os diferentes métodos empregados pelos laboratórios.

Com relação aos métodos analíticos, três etapas são críticas: extração e quantificação dos lipídios, preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir dos lipídios extraídos e quantificação dos AG.

#### ■ **Extração e quantificação dos lipídios totais**

A extração de lipídios é uma etapa importante no estudo nutricional dos alimentos e, especialmente, na determinação da composição de ácidos graxos. A preparação da amostra para esta determinação deve ser cuidadosa sendo que em alguns procedimentos e matrizes pode ocorrer a co-extração dos não lipídios, oxidação indesejada, perda dos compostos mais voláteis e dificuldade de extração dos lipídios ligados a outras moléculas, influenciando na qualidade final do óleo, e no perfil de ácidos graxos<sup>23,24,25,29</sup>.

A quantificação dos lipídios dos alimentos é realizada, tradicionalmente, por extração com solventes orgânicos e determinação gravimétrica. A habilidade de recuperar os vários componentes dos lipídios varia com o solvente de extração. A ampla faixa de polaridade dos lipídios, os diferentes tipos de ligações e energias fazem com que a escolha do solvente seja uma tarefa difícil. Os solventes mais utilizados são: éter etílico, éter de petróleo e clorofórmio-metanol. Todos estes solventes extraem triacilgliceróis. O éter etílico e o de petróleo extraem

mono, di e triacilgliceróis, esteróis e ácidos graxos. Solventes mais polares, como a mistura de clorofórmio e metanol, também extraem lipídios polares como fosfolipídios, esteróis, terpenos, ceras, hidrocarbonetos e outros componentes não lipídicos<sup>7,23,29,30</sup>.

Os métodos que empregam a mistura clorofórmio metanol, como por exemplo, o de Bligh e Dyer (1959)<sup>31</sup> e de Folch, Lees, Stanley (1957)<sup>32</sup>, são reconhecidos como os mais adequados para a extração de todos os componentes dos lipídios, sendo que o extrato obtido pode ser empregado para a caracterização das frações<sup>7,33,34</sup>. Nestes métodos, as proporções entre os solventes de extração, massa da amostra e solventes, o modo de preparação da amostra, o tempo de agitação, o teor de gordura, água e o tipo de produtos, são críticos, influenciando a eficiência de extração<sup>35,36,37</sup>.

Para facilitar a extração dos lipídios ligados a outros componentes dos alimentos, as matrizes alimentares são frequentemente tratadas. Estes tratamentos incluem hidrólises ácida, básica, mista ou enzimática, secagens, pré-lavagens, entre outros<sup>7,23,24,25</sup>.

Os métodos que envolvem hidrólise ácida tendem a decompor os fosfolipídios e, possivelmente, os triacilgliceróis, dependendo da concentração do ácido utilizado. A hidrólise ácida, seguida da extração com éter de petróleo, extrai os lipídios neutros e também pode extrair outros constituintes que não compõem a gordura, tais como: glicerol, carboidratos de baixo peso molecular e seus produtos de polimerização, aminoácidos e sais de ureia. Os resultados obtidos por este método normalmente superestimam o valor da gordura total, comprometendo, também, a avaliação da composição de ácidos graxos dos alimentos<sup>23,34</sup>.

Apesar de existirem métodos analíticos de extração de lipídios recomendados para certas classes de alimentos, estes estão em constante avaliação devido a grande variedade de produtos lançados no mercado, elaborados com novas tecnologias (por exemplo, o micro-encapsulamento de nutrientes), e contendo variados aditivos, o que certamente interfere na extração dos lipídios.

Nos Estados Unidos, a partir do estabelecimento, em 1990, da lei sobre educação nutricional e rotulagem dos alimentos<sup>6</sup>, uma força tarefa organizada pela "Association of Official Analytical Chemists", AOAC, reconheceu alguns métodos que deveriam ser aplicados para análise de gordura em diferentes matrizes alimentares para fins de rotulagem nutricional, mas considerou que tais métodos deveriam ser aperfeiçoados<sup>30</sup>. Foi adotada

uma definição química para gordura, para fins de rotulagem nutricional, a qual limita o que é quantificado, evitando, assim, o emprego de diferentes metodologias que forneçam resultados muito discrepantes<sup>28</sup>. Foram desenvolvidos métodos hidrolíticos de extração de lipídios e ácidos graxos do alimento e de determinação da gordura total, por cálculo matemático, a partir dos AG obtidos por CG/DIC. O método AOAC 996.01 (1996) foi avaliado e adotado como oficial para a determinação de gordura e ácidos graxos para produtos a base de cereais contendo de 0,5 a 13% de GT<sup>7,38</sup>. O método AOAC 996.06, semelhante ao anterior, foi desenvolvido para a extração e determinação da gordura total dos alimentos em geral, a partir da análise de ácidos graxos por CG/DIC<sup>7,39,40</sup>.

Algumas técnicas mais modernas de extração de gordura têm sido propostas para reduzir significativamente o tempo e o consumo de solvente e fornecer resultados equivalentes. Entre estas técnicas, destacam-se a extração acelerada com solvente (EAS), a extração com fluido supercrítico (EFSC), a extração dinâmica por ultra-som e com auxílio de microondas<sup>25,41</sup>. Entretanto, a desvantagem destes métodos é a necessidade de otimizar as variáveis que influenciam na extração para cada tipo de produto, uma vez que os teores de gordura e de água dos alimentos afetam a eficiência de extração<sup>29,41</sup>.

Nas análises de rotina de muitos laboratórios brasileiros dois tipos de extração de gordura são empregados, visando gerar dados para a informação da rotulagem nutricional. Uma delas objetiva a determinação da GT do alimento e a outra a de AG. Para determinação da composição dos AG emprega-se extração a frio como no método de Bligh e Dyer, utilizando a mistura de solventes de extração clorofórmio/metanol, ou éter etílico visando não alterar a gordura original do alimento e, portanto, os AG<sup>28,31</sup>. Este procedimento de trabalho, entretanto, implica em maior tempo de análise e exposição do analista, custos com solventes, materiais, energia, entre outros.

A Tabela 1 apresenta um resumo sobre os principais métodos convencionais de extração de lipídios, campo de aplicação, vantagens e limitações.

### **Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos**

A análise por cromatografia em fase gasosa dos ácidos graxos, livres ou ligados aos diferentes componentes lipídicos dos alimentos, requer sua prévia transformação em derivados mais voláteis e, normalmente, são preparados ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG).

**Tabela 1.** Métodos convencionais de extração de lipídios: princípio, campo de aplicação, vantagens e limitações<sup>7,23,24,25,29,30,32,33</sup>.

Método	Princípio	Campo de aplicação/ métodos oficiais	Vantagens	Limitações
Extração com éter etílico ou de petróleo/ gravimetria	Extração por passagem contínua ou intermitente de solvente na amostra em equipamento como Soxhlet	Sementes oleaginosas AOAC 948.22 Produtos cárneos AOAC 960.39 Cereais AOAC 945.18 A Manteiga AOAC 938.06 Rações AOAC 920.39B,C	Automação Boa repetitividade Padronização	Procedimento demorado Não extrai lipídios polares Não aplicado a alimentos com muita umidade Subestima teor de gordura total
Extração a frio com clorofórmio/metanol/ gravimetria	Extração baseada nos métodos de: Folch, Lees e Stanley (1957) Clorofórmio:Metanol (2:1) solvente/amostra 20:1 Bligh e Dyer (1959) Clorofórmio:Metanol:água (1:2:0,8)	Tecidos biológicos (produtos cárneos, ovos, produtos lácteos). Qualquer alimento que não possua metodologia estabelecida: AOAC 983.23, AOAC 969.24.	Extração de lipídios neutros e polares Preservação de AG de baixo PM e poli-insaturados	Procedimento demorado. Co-extração de proteínas Proporções entre os solventes e amostra são críticas Solventes tóxicos Custos - descarte de resíduos
Hidrólise ácida/ extração com solventes/ gravimetria	Hidrólise com aquecimento e extração com solventes (éter petróleo e/ou etílico)	Produtos de cacau AOAC 963.15 Ovos AOAC 925.32 Molhos AOAC 950.54 Farinhas pães e produtos de panificação AOAC 922.06 Macarrão AOAC 925, 12; 935.39D; 935.38 Frutos do mar AOAC 948.15 e outros	Métodos oficiais Boa repetitividade Extração de lipídios neutros e polares	Procedimento demorado Hidrólise de TAG e FL Extração de compostos não lipídicos (glicerol, carboidratos de baixo PM, e produtos de polimerização) Emprego de ácidos fortes Comprometimento de ácidos graxos com sítios reativos (insaturações)
Hidrólise alcalina/ extração com solventes/ gravimetria	Hidrólise com NH <sub>4</sub> OH etanólico/ extração com éter de petróleo+éter etílico/gravimetria. (Mojonier ou Roese Gottlieb)	Leite e produtos lácteos AOAC 989.05 AOAC 905.02 AOAC 932.06	Método oficial Extração de lipídios neutros e polares	Hidrólise de TAG Perda de componentes dos lipídios na fase aquosa

As reações de derivação são geralmente catalisadas por ácidos (Ex: trifluoreto de Boro ( $\text{BF}_3$ )), ou bases, e envolvem os processos de hidrólise e esterificação (normalmente metilação) ou transesterificação. Os ésteres metílicos se formam a partir de: 1) ácidos graxos livres em meio ácido ou com diazometano (esterificação); 2) ácidos graxos ligados a lipídios por ligações ésteres, (triacilgliceróis, fosfolipídios) em meio ácido ou básico e, 3) ácidos graxos ligados a grupamento N-acila em lipídios complexos em meio ácido<sup>42</sup>.

São descritos muitos procedimentos e cada método possui vantagens e limitações, dependendo das características da gordura a ser analisada, como apresentado na Tabela 2.

Com o intuito de abreviar o tempo de reação, pode ser feita uma transesterificação direta na presença de catalisadores básicos ( $\text{NaOH}$ ,  $\text{KOH}$ , metóxido de sódio) ou ácidos ( $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{BF}_3$ ). Entretanto, a reação não ocorre para ácidos graxos livres e, no caso da catálise básica, pode não esterificar óleos e gorduras com alta acidez<sup>42, 43</sup>. Por outro lado, a transesterificação alcalina ocorre em condições mais amenas de temperatura e tempo reduzido. Este procedimento tem sido aplicado na preparação de EMAG de gordura de leite, produto com quantidade considerável de ácidos graxos saturados voláteis e de baixo peso molecular<sup>42</sup>; de EMAG ciclopropenídicos que são grupamentos altamente lábeis<sup>44</sup>, em óleos vegetais refinados<sup>45,46,47</sup> e também na análise de produtos alimentícios diversos, mostrando resultados comparáveis a procedimentos com catálise mista<sup>48</sup>.

Nas reações com catálise ácida pode ocorrer isomerização de ácidos graxos insaturados, principalmente os conjugados, quebra de grupamentos reativos como os grupos ciclopropenídicos, além dos processos em meio ácido necessitem de aquecimento, o que pode comprometer os ácidos graxos de baixo peso molecular presentes, por exemplo, na gordura do leite<sup>42</sup>.

Os métodos mais eficientes de preparação dos EMAG empregam os dois tratamentos, ácido e básico, como o procedimento de Hartman e Lago<sup>49</sup>, amplamente utilizado nos laboratórios brasileiros.

Na literatura, são descritos procedimentos de transesterificação direta (*in situ*) sem extração prévia de gordura, para pequenas quantidades de amostras de óleos vegetais, gorduras dos alimentos, tecidos ou fluidos biológicos<sup>41,50,51,52</sup>. Os procedimentos consistem da mistura da amostra com os reagentes de esterificação, aqueles já utilizados para a reação nos lipídios previamente extraídos,

tais como: cloreto metanólico de hidrogênio; metóxido de sódio metanólico, hidróxido de sódio metanólico e solução de  $\text{BF}_3$ <sup>41,50,51,52,53</sup>. O método AOCS Ce 1k-07, utiliza hidrólise alcalina e metilação com  $\text{BF}_3$  metanólico e aplica-se a matrizes contendo óleos vegetais (alimentos, bebidas, tecidos e óleos), mas não se aplica a produtos lácteos e gorduras de animais ruminantes<sup>52</sup>. Nestes procedimentos diretos há economia de tempo de análise e solventes, pois ocorre a síntese de ésteres de ácidos graxos por extração e derivação simultâneas. A diminuição na manipulação da amostra contribui para diminuir o erro experimental. Por outro lado, o teor de água dos alimentos, a tomada de amostra, a escolha dos reagentes (catalisador) e as condições da análise, como por exemplo a temperatura, são fatores decisivos na eficiência das reações diretas<sup>41,51</sup>.

#### ■ Determinação de AG em produtos alimentícios

A evolução da técnica de cromatografia em fase gasosa está diretamente associada com a análise de ácidos graxos. James e Martin (1952)<sup>54</sup> foram os primeiros a separar uma série de ácidos graxos voláteis em um cromatógrafo a gás com coluna empacotada.

A partir dos anos 70, os teores de ácidos graxos dos alimentos passaram a ser determinados por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama. A base para a separação dos componentes na CG é a partição da amostra no estado de vapor entre duas fases, uma fase estacionária (FE) (sólida ou líquida) e uma fase gasosa móvel. Na separação de ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) as FE mais adequadas são de polímeros polares como poliésteres (Carbowax 20M) e cianosiliconas (SP 2340, SP 2560). Após a separação, na coluna cromatográfica, os componentes são direcionados ao sistema de detecção. Na análise de EMAG, normalmente, é empregado um detector de ionização de chama<sup>55</sup>.

Os teores dos EMAG eram inicialmente expressos em porcentagens de área ou massa no total de ésteres metílicos. Esta é uma maneira simplificada de apresentar a concentração dos componentes sem a empregar cálculos mais complexos ou padrões de alta pureza

Entretanto, a necessidade de expressar o teor dos ácidos graxos em gramas por cem gramas do alimento, principalmente nos estudos nutricionais, levou a publicação, na década de 70, de vários trabalhos pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (U.S.D.A) sobre os dados analíticos de lipídios e ácidos graxos de diversas classes de alimentos. Os dados foram levantados, para diferentes produtos, isto é, lácteos,

**Tabela 2.** Principais reagentes para preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos, vantagens e limitações<sup>31,34,41,42,48,49,53</sup>.

Reagente/ catalisador	Grupos de moléculas esterificadas	Vantagens	Limitações
5% HCl anidro em metanol Ácido	Ácidos graxos livres ou ligados ao glicerol ou colesterol	Reagente eficiente na esterificação	Não derivam ácidos graxos ligados a amidas Tempo longo de reação e aquecimento Destroi grupos funcionais ligados aos ácidos graxos tais como: epóxi, ciclopropano e ciclopropeno
NaOH 0,5N/ NH <sub>4</sub> Cl/ metanol/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Hartman e Lago <sup>49</sup> ) Ácido/básico	Ácidos graxos livres ou ligados ao glicerol ou colesterol	Reagente barato, procedimento rápido e simples Tempo e temperatura reduzidos	Não derivam todos os componentes ligados aos ácidos graxos Destroi grupos funcionais ligados aos ácidos graxos tais como: epóxi, ciclopropano e ciclopropeno
Metanol + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1-2%) Ácido	Ácidos graxos livres ou ligados ao glicerol ou colesterol	Reagente barato e eficiente na esterificação	Tempo longo de reação e aquecimento. Pode alterar os ácidos graxos poli-insaturados Destroi grupos funcionais ligados aos ácidos graxos tais como: epóxi, ciclopropano e ciclopropeno
BF <sub>3</sub> / metanol (7% - 14%) + NaOH metanol 0,5N Ácido/Básico	Ácidos graxos livres ou ligados ao glicerol ou colesterol.	Método Oficial AOAC AOCS	Reagente instável. e tóxico Não derivam todos os componentes ligados aos ácidos graxos Formação de produtos secundários Tempo longo de reação e aquecimento
KOH/ metanol 2M Básica	Ácidos graxos ligados ao glicerol Transesterificação	Reação rápida e a frio Preserva AG de baixo peso molecular, poliinsaturados, cíclicos e conjugados poli-insaturados	Saponificação de ácidos graxos de baixo peso molecular Não se aplica a ácidos graxos livres Não se aplica a óleos com acidez alta
Metóxido de sódio (NaOCH <sub>3</sub> ) Básica	Ácidos graxos ligados ao glicerol. Básica Transesterificação	Preserva AG de baixo peso molecular, poliinsaturados, cíclicos e conjugados poli-insaturados	Não se aplica a ácidos graxos livres e ligados a amidas (esfingolípídios). Não se aplica a gorduras com acidez alta



ovos e derivados, sementes oleaginosas, sopas, óleos e gorduras, carne suína e derivados, carne bovina, cereais, entre outros<sup>56,57</sup>. Foram calculados fatores apropriados que ponderam a contribuição das diferentes frações dos lipídios (ex: triacilgliceróis, fosfolipídios) no fornecimento dos ácidos graxos nos alimentos. Desta forma foi calculado um fator de conversão médio aplicável ao total de lipídios<sup>56,57</sup>. Para expressar o conteúdo de AG em gramas por cem gramas do alimento a porcentagens de área ou massa no total de ésteres metílicos, obtido na análise por CG, deve ser multiplicada pelo teor de lipídios do alimento e pelo fator de conversão médio teórico. Na Tabela 3 encontram-se os fatores teóricos para diferentes classes de alimentos<sup>31,56</sup>.

**Tabela 3.** Fatores de conversão teóricos de gordura para ácidos graxos em diferentes alimentos<sup>56</sup>.

Alimento	Fator g de ácidos graxos/ g de lipídios
Óleos, gorduras e sementes oleaginosas	0,956
Produtos lácteos	0,945
Ovos	0,830
Frutas e vegetais	0,800
Carnes gordas bovina, suína e ovina	0,953
Carne magra bovina e ovina	0,916
Carne magra suína	0,910
Carne de frango	0,945
Carne gorda de peixe	0,900
Carne magra de peixe	0,700

Dependendo do alimento, os lipídios terão diferentes quantidades de triacilgliceróis, fosfolipídios e outros componentes que fornecerão teores variados de ácidos graxos<sup>56</sup>. Os lipídios de óleos, gorduras e sementes oleaginosas são constituídos essencialmente de TAG, os quais contêm cerca de 0,956g de ácidos graxos por grama de gordura. Por outro lado, os lipídios de diversos alimentos, como os ovos e os produtos cárneos, contêm quantidades consideráveis das outras frações lipídicas. Na

gordura do ovo encontramos, por exemplo, cerca de 65% TAG e 29% de fosfolipídios (FL), sendo que um grama de FL contém, em média, 0,720 g de AG. Sendo assim, um grama dos lipídios do ovo terá cerca de 0,62 g de AG, provindos dos TAG e cerca de 0,21g dos FL<sup>58</sup>. Na elaboração de tabelas de composição de alimentos de vários países são empregados aqueles fatores de conversão teóricos.

A demanda de informações mais precisas sobre o conteúdo dos ácidos graxos nos alimentos, aliada a uma maior disponibilidade de padrões e a evolução nas tecnologias das colunas e equipamentos de CG, tem proporcionado um maior rigor quantitativo dos métodos oficiais. Nestes, os EMAG são analisados por CG/DIC empregando colunas capilares, com fases estacionárias polares, e quantificados com padrão interno (PI). Dependendo das condições operacionais, das fases estacionárias e do comprimento da coluna cromatográfica, é possível obter a separação dos isômeros geométricos e de posição dos ácidos graxos<sup>31,51,59,60,61</sup>.

O padrão interno é normalmente um EMAG (13:0, 11:0, 23:0) ou um TAG (13:0; 17:0, 19:0, 21:0, 23:0) com número ímpar de carbonos, uma vez que muitos destes não são encontrados na gordura dos alimentos. O cálculo da composição dos analitos de interesse é feito com relação à área e massa daqueles padrões. São empregados fatores de correção de resposta do detector de ionização de chama (DIC), experimentais ou teóricos<sup>7,31,51,59,60,61</sup>.

Dependendo do tipo de cálculo adotado para a quantificação dos AG por CG/DIC podem-se gerar variações significativas dos resultados expressos em gramas por cem gramas do alimento<sup>26,27</sup>. Realizar o cálculo por normalização de área empregando os fatores teóricos, como descrito acima, é uma maneira simplificada de apresentar a concentração dos componentes. Entretanto, os métodos quantitativos por normalização de área têm a desvantagem da propagação do erro, pois os resultados de todos os componentes estão correlacionados, e os teores são normalmente superestimados. Contudo, este é ainda um procedimento amplamente empregado nos laboratórios brasileiros<sup>31,26</sup>.

O método mais acurado emprega PI e os fatores de correção de resposta do DIC são calculados, a fim de corrigir a não linearidade da resposta com a massa dos EMAG, principalmente, para aqueles de baixo peso molecular (menor que 12 átomos de carbono). Os fatores teóricos são calculados por uma fórmula, considerando a resposta proporcional à porcentagem relativa de carbonos ativos nas diversas moléculas. A utilização deste fator nos

cálculos requer uma prévia otimização das condições do cromatógrafo. Por outro lado, o fator de correção empírico ou experimental (FCE), considera tanto os desvios químicos como os instrumentais. Este é calculado a partir da análise de padrões de EMAG<sup>31,62,63</sup>. O emprego de um outro fator de correção nos cálculos depende da recomendação do método oficial<sup>7,51,61</sup>, e pode também gerar discrepâncias nos resultados<sup>26,64</sup>.

#### ■ Determinação de ácidos graxos *trans* (AGT)

As metodologias descritas na literatura para a análise dos ácidos graxos *trans* incluem: análise por espectroscopia no infravermelho com leitura em  $966\text{ cm}^{-1}$ , onde ocorre absorção das insaturações que possuem hidrogênios na configuração *trans*. Por esta metodologia oficial são determinados os ácidos graxos *trans* totais, isto é, ligações duplas isoladas, entretanto sem diferenciar os isômeros, sendo apropriada para análise de óleos e gorduras contendo mais de 5% de ácidos graxos *trans*<sup>61,65</sup>. O método envolve a preparação de EMAG e a varredura da amostra na região de  $900\text{ a }1050\text{ cm}^{-1}$ . A quantificação para teores de AGT inferiores a 5% é prejudicada em gorduras que contenham, por exemplo, ligações duplas *trans* de sistemas conjugadas e outros interferentes que alterem a região de absorção dos AGT. Avanços na técnica de infravermelho utilizando células, para atenuação da reflexão total, associada ao processamento matemático dos espectros por transformada de Fourier tem tornado possível a determinação dos AGT de forma mais rápida e/ou mais acurada<sup>22,65,66</sup>. A ressonância magnética nuclear (RMN) também é utilizada para determinar ácidos graxos *trans* em gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GVPH). Entretanto, trata-se de uma técnica cara e aplicada para níveis superiores a 3% de AGT<sup>67</sup>.

As legislações atuais sobre rotulagem nutricional não exigem a diferenciação dos isômeros *trans*. Entretanto, devido às evidências científicas que alguns isômeros *trans* podem ser nutricionalmente ou fisiologicamente benéficos à saúde, tais como o isômero conjugado 18:2 (9*c*,11*t*) e seu precursor, o ácido *trans* vacênico 18:1(11*t*), o emprego de técnicas que permitam a separação dos vários componentes torna-se o mais apropriado<sup>68</sup>.

#### ■ Determinação de AG *cis/trans* por CG em colunas capilares

O método indicado para as análises de rotina de ácidos graxos, inclusive *trans*, devido à sensibilidade, ao custo e

por possibilitar a determinação de toda a composição de ácidos graxos em uma única corrida, emprega a técnica de cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG/DIC). Para a separação dos isômeros são utilizadas colunas capilares de sílica fundida longas (100 m) com fases estacionárias de alta polaridade (ciano propil siloxano), com os nomes comerciais: SP 2560, CPSil 88, SP 2380, BPX 70, CP 7420<sup>51,61</sup>. Entretanto, mesmo com a otimização dos parâmetros cromatográficos não é possível a resolução de todos os isômeros geométricos e de posição presentes numa amostra de GVPH ou gordura de animais ruminantes. Existem diferenças no desempenho da separação de componentes críticos, empregando colunas comerciais de 100 m de fabricantes diferentes ou mesmo entre as colunas de mesmo fabricante, mas de diferentes lotes. Fatores como gás de arraste e quantidade de amostra injetada na coluna influenciam também no desempenho da separação<sup>65,68</sup>. A separação dos isômeros geométricos e de posição presentes numa amostra de GVPH ou gordura de animais ruminantes pode ser otimizada em análise prévia por cromatografia em camada delgada ou cromatografia líquida de alta eficiência com íon prata para fracionar os diversos isômeros. Os íons de prata formam complexos com os ácidos graxos insaturados possibilitando o fracionamento. O ponto desfavorável desta associação de técnicas é o tempo elevado de análise, não sendo apropriado nos procedimentos rotineiros<sup>22,65,68</sup>.

#### ■ Isômeros do ácido octadecenóico (18:1)

Os isômeros do ácido octadecenóico são os mais abundantes e em maior número nas GVPH e de animais ruminantes. A adequada separação destes componentes é um ponto importante na definição da melhor metodologia de quantificação do total de ácidos graxos *trans*.

As colunas cromatográficas comerciais citadas anteriormente fornecem uma boa resolução (a partir da linha de base) para a maioria dos isômeros *cis* e *trans* do ácido octadecenóico presentes nas gorduras. Os isômeros *trans* encontrados naquelas gorduras são: 18:1(4*t*) a 18:1(16*t*) e o principal *cis* é o 18:1(9*c*), além de quantidades menores de 18:1(11*c*) a 18:1(16*c*). Considerando uma determinada posição da dupla ligação, os isômeros *trans* sempre eluem antes do correspondente isômero *cis* majoritário, nas colunas acima citadas<sup>45, 69,70</sup>.

A extensão das sobreposições dos isômeros depende da fase estacionária, da concentração dos diferentes componentes da amostra, do comprimento, tipo, marca e até o lote da coluna capilar, além das temperaturas de ope-

ração do cromatógrafo a gás<sup>65</sup>. As colunas de 100 m são as mais eficientes, sendo que a sobreposição dos isômeros pode ser minimizada. A otimização da temperatura de operação é fundamental para evitar co-eluições. Tem sido demonstrado que numa coluna SP 2560 aquecida a 180°C (isotérmica) obtém-se a melhor condição para determinação de ácidos graxos *trans* totais para fins de rotulagem nutricional em óleos vegetais e produtos que contenham gorduras parcialmente hidrogenadas<sup>61</sup>.

#### ■ Isômeros dos ácidos octadecadienóico (18:2) e octadecatrienóico (18:3)

Os isômeros dos ácidos octadecadienóico (18:2) e octadecatrienóico (18:3) estão sempre presentes tanto nas GVPH como nas gorduras de animais ruminantes e nos óleos vegetais poli-insaturados refinados, porém em baixas concentrações. Para uma determinação mais exata dos isômeros *trans* nos alimentos é necessária a inclusão destes componentes. Os principais isômeros do ácido 18:2, presentes na GVPH, são: 9*t*,13*t*; 9*c*,12*t*; 9*t*,12*c*, podendo chegar a 6% na gordura submetida à hidrogenação moderada<sup>45,70,71</sup>.

Os principais isômeros do ácido octadecatrienóico (18:3) estão presentes em menores quantidades nas gorduras. Os mais comuns são: 9*t*,12*c*,15*t*; 9*c*,12*c*,15*t*; 9*t*,12*t*,15*c*; 9*t*,12*c*,15*c* e 9*c*,12*c*,15*c* (ácido alfa-linolênico), sendo esta a ordem de eluição numa coluna com FE de cianopropil siloxano. Em algumas programações, dependendo da temperatura da coluna de 100 m, da diluição da amostra e da quantidade dos componentes no óleo ou gordura, o ácido eicosaenóico 20:1 (11*c*), presente em pequenas quantidades em óleos vegetais, pode eluir antes ou depois do ácido alfa linolenico (18:3 (9*c*,12*c*,15*c*)) ou mesmo coeluirem. A análise isotérmica a 180°C, em coluna SP 2560 ou equivalente, é a que tem apresentado a melhor separação para aquele par crítico de ácidos graxos<sup>45,61,68,69</sup>.

Os principais isômeros *cis/trans* formados, no caso dos óleos vegetais refinados poli-insaturados, são 18:2 e 18:3, principalmente quando se empregam temperaturas de desodorização altas (230-250°C)<sup>70</sup>. Os níveis destes ácidos variam normalmente entre 0-2% e os teores obtidos são muitas vezes utilizados na avaliação do processamento ou como critério de rejeição de produto nas transações comerciais. A análise nesta faixa de concentração requer a otimização dos parâmetros analíticos tais como: tipo e temperatura da coluna, quantidade de amostra injetada, parâmetros de processamento dos picos como mínima

área, visando detectar picos com cerca de 0,01% (% p/p de ésteres metílicos)<sup>71,72</sup>.

#### ■ Ácidos graxos da gordura de animais ruminantes

A gordura de animais ruminantes contém AGT, porém com características diferentes da GVPH. Quando comparado a GVPH, o número de isômeros é inferior e as sobreposições ocorrem em menor extensão (principalmente do 18:1). Dentre as gorduras de animais ruminantes, a dos produtos lácteos são as mais complexas. Podem conter centenas de ácidos graxos, isto é, saturados de 4 a 24 átomos de carbono, monoinsaturados, poli-insaturados, ramificados e diversos isômeros *trans*, principalmente do 18:1 além dos isômeros conjugados do ácido linoleico (CLA). Face às evidências benéficas à saúde destes últimos componentes e à variedade de matrizes alimentares disponíveis, tem sido necessário o desenvolvimento de métodos adequados à quantificação dos diversos ácidos graxos na mesma corrida. Kramer, Blackadar, Zhou<sup>73</sup>, realizaram um estudo bastante minucioso, comparando o desempenho de duas colunas cromatográficas, uma de alta polaridade (FE cianopropil siloxano) e longa (CP Sil 88, 100 m) e outra mais curta com polaridade inferior (Supelcowax 10 de 60 m, FE polietilenoglicol) para separação de ácidos de baixo peso molecular, isômeros *cis/trans*, inclusive CLA, em gordura de leite de vaca. Neste estudo ficou bastante evidente que colunas longas (100 m), e de alta polaridade, como CP Sil 88 ou SP 2560, são as mais eficientes para a separação de uma ampla gama de ácidos graxos que estão presentes na gordura do leite, inclusive os isômeros *cis/trans*.

Destailats et al<sup>74</sup> compararam diferentes técnicas para a determinação de AGT, especialmente o total dos isômeros *trans* 18:1 e o *trans* vacênico (18:1 11*t*), em gordura de animais ruminantes. Aqueles pesquisadores, por intermédio da otimização da análise direta por CG/DIC, em coluna de 100 m, CP Sil 88, obtiveram resultados similares às outras técnicas que empregam fracionamento prévio dos isômeros tais como CCD e CLAE com íons de prata e posterior análise por CG/DIC .

Golay et al<sup>50</sup>, validaram uma metodologia para a determinação de ácidos graxos em produtos lácteos, inclusive *trans*, na qual não é necessária a extração prévia da gordura e a transesterificação dos lipídios é feita diretamente. As condições da análise cromatográfica também foram otimizadas, para evitar o fracionamento previamente dos isômeros *cis/trans* por CCD.

Em 2007 a AOCS publicou uma metodologia oficial (AOCS Ce 1j-07) para a determinação de ácidos

graxos, inclusive *trans* em gorduras lácteas e de animais ruminantes<sup>52</sup>, levando em conta as condições analíticas estabelecidas nos trabalhos de Kramer, Blackadar, Zhou<sup>73</sup> e Golay et al<sup>50</sup>.

Considerando que uma única técnica cromatográfica não é capaz de resolver todos os EMAG da gordura láctea, alternativas mais modernas como as técnicas de cromatografia multidimensional têm sido propostas para melhorar esta separação. Neste tipo de técnica são empregadas combinações de colunas com fases estacionárias de diferentes polaridades e tamanhos e são moduladas as concentrações dos analitos a serem analisados, sendo apropriada para amostras com analitos em concentrações bem diversas<sup>75</sup>.

#### ■ Determinação de GT e AG *cis/trans* visando à informação nutricional na rotulagem dos alimentos

Uma vez que as legislações sobre rotulagem nutricional não especificam a metodologia analítica para a determinação de ácidos graxos *trans*, vários grupos de pesquisa têm se empenhado em estabelecer procedimentos rápidos e confiáveis, aplicáveis a um grande número de amostras, isto é, óleos refinados, produtos lácteos e produtos alimentícios que contenham gordura hidrogenada. Este é um grande desafio analítico, uma vez que a natureza e nível de concentração dos isômeros presentes são bastante variados.

A aplicabilidade dos métodos AOAC 996.01 e 996.06, para determinação de GT e AG, visando à informação na rotulagem nutricional tem sido comprovada para diversas matrizes de alimentos com variadas quantidades de gordura<sup>26,76-80</sup>.

Um grupo de pesquisadores do FDA (Food and Drug Administration), dos Estados Unidos, da Divisão de Rotulagem Nutricional, modificou o método oficial AOAC 996.01 originalmente desenvolvido para análise de ácidos graxos em produtos derivados de cereais. O método foi empregado na quantificação dos AG, incluindo os *trans*, em materiais certificados (fórmulas infantis)<sup>78,79</sup> e em uma grande variedade de produtos<sup>80</sup>.

De Vries et al.<sup>81</sup> propuseram alterações no método AOAC 996.06, as quais prevêem a utilização de colunas cromatográficas mais longas (SP 2560, 100 m), e de um número maior de padrões cromatográficos de EMAG para a separação e identificação dos componentes, além da utilização da técnica de cromatografia gasosa com detector de massas (CG/DM) para confirmar a identidade de ácidos graxos. Neste trabalho sugeriu-se a introdução

de tabelas com valores de retenção relativa dos AG e recomenda-se que a coluna empregada seja capaz de resolver os picos adjacentes 20:1/18:3 e 22:1/20:3/20:4, com valores de resolução mínima de 1,0. Estas recomendações foram introduzidas no método AOAC 996.06 na revisão publicada em 2001. Rozena et al. (2008) propuseram novas modificações no método visando principalmente otimizar a separação dos AGT<sup>82</sup>.

Vários métodos oficiais da American Oil Chemists Society foram publicados considerando o cálculo da gordura total a partir dos ácidos graxos obtidos por CG/DIC, com fins para a informação nutricional. O método AOCS Ce1h-05 (2005) foi desenvolvido por um grupo de especialistas de indústrias e laboratórios do Estados Unidos com o apoio do Food and Drug Administration (FDA) e do Ministério da Saúde do Canadá. Está no campo de aplicação a determinação de ácidos graxos *cis/trans* em amostras de GVPH e em óleos vegetais refinados, não sendo indicado para a determinação daqueles ácidos graxos em outras gorduras como a de animais ruminantes. O método AOCS Ce 1j-07 (2007) é aplicado à análise de gorduras lácteas e de outros animais ruminantes.

Tendo em vista a globalização dos mercados, os países que adotam a declaração obrigatória de GT e AG nos rótulos dos produtos embalados, como o Brasil, devem buscar a padronização dos métodos analíticos. Adicionalmente, é fundamental aprofundar os conhecimentos sobre os métodos oficiais recomendados pela AOAC e AOCS para a informação nutricional, uma vez que a Comissão do *Codex Alimentarius* tem proposto o endosso de métodos como o AOAC 996.06 para a determinação de GT e dos ácidos graxos saturados nos alimentos e o AOCS Ce 1h-05 para a quantificação de ácidos graxos poli-insaturados e *trans*<sup>83</sup>, no caso de disputas comerciais entre países.

## CONCLUSÃO

Os aspectos abordados nesta revisão evidenciam a grande influência que o conjunto de variáveis escolhidas nos procedimentos de análise e quantificação de lipídios totais e ácidos graxos exercem nos valores obtidos, culminando em distorções sérias apresentadas nos rótulos dos produtos alimentícios disponíveis no mercado. Tais evidências reforçam a necessidade de padronização das metodologias analíticas nos laboratórios brasileiros, o que é primordial para uma informação mais uniforme e

exata ao consumidor, garantido o seu direito de escolha de alimentos saudáveis, além de favorecer a inserção dos produtos brasileiros no mercado internacional.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p.33-4, . 26 de dez. 2003. Seção 1.
2. Hawke C. Nutrition labels and health claims: the global regulatory environment. Geneva: World Health Organization; 2004.
3. Organización Mundial de la Salud - OMS -. Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física e salud. 57º Asamblea Mundial de la Salud Ginebra; 2004 (WHA 57.17).
4. Organización Mundial de la Salud. – OMS. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Ginebra; 2003 (Serie de informes técnicos. 916).
5. Federal Register, Washington, Food and Drug Administration, Food labeling: *trans* fatty acids in nutrition labeling; consumer research to consider nutrient content and health claims and possible footnote or disclosure statements. Final rule and proposed rule. Acesso em: 12 out. 2003. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>.
6. Federal Register, Washington, Food and Drug Administration. Nutritional and Labeling Educational Act. NLEA. 1990; 55, 29487.
7. Official Methods of Analysis of AOAC. 18<sup>th</sup> ed., Gaithersburg: AOAC International, 2005.
8. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC et al. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 2005; 46:840-61.
9. Curi R, Pompeia C, Miyasaka CK, Procópio J. Entendendo as gorduras – os ácidos graxos. 1ª ed., São Paulo: Ed. Manole 2002 580p.
10. Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet the omega6/omega3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharm* 2006; 60:502-507.
11. Ascherio A, Katan MB, Stampfer MJ, Willet WC. *Trans* fatty acids and coronary heart disease. *N Engl J Med*. 1999; 340:1994–8.
12. Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett, WC. *Trans* fatty acids and cardiovascular disease. *N Eng J Med* 2006; 354:1601-13.
13. Martinez TLR, Santos RD, Armaganijian D, Torres KP, Loure-Vale A, Magalhães ME et al. National alert campaign about increased cholesterol, determination of cholesterol levels in 81,262 Brazilians. *Arq Bras Cardiol*. 2003; 80:635-8.
14. Hulshof K, Erp-Baart MA, Anttolainen M, Becker W, Church SM, Couet C et al. Intake of fat and fatty acids in Western Europe with emphasis on *trans* fatty acids: the transfair study. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53,143-57.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27 de 13 de janeiro de 1998. Aprova regulamento técnico referente à Informação nutricional complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes), constantes do anexo desta portaria. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p. 1 - E-4 de 16 de jan. 1998. Seção 1-E.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 40, de 21 março de 2001. Dispõe sobre Regulamento Técnico Obrigatório sobre rotulagem nutricional de alimentos e bebidas embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p.22-5, 22 de mar. 2001. Seção 1.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 359, de 23 dez. 2003. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. . Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p.34-7, 26 de dez. 2003. Seção 1.
18. Federal Register, Washington, Food and Drug Administration. Food labeling: mandatory status of nutrition labeling and nutrient content revision, format for nutritional label. Part 101- Food labeling. 1993; 58: 2175-205.
19. Mancini-Filho J, Takemoto E, Aued-Pimentel S. Parâmetros de identidade e qualidade de óleos e gorduras. In: Almeida-Muradian LB, Penteado MVC. Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007 p. 81-107.
20. Leth T, Jensen HG, Mikkelsen AE, Bysted A. The effect of the regulation on *trans* fatty acid content in Danish food. *Atherosclerosis (Suppl)* 2006; 7:53-6.
21. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA [ Sistema de Perguntas e Respostas]. Gordura *trans* FAQ 1571. [Acesso em 16 set 2007]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/faqdinamica>.
22. Mossoba MM, Kramer JKG, Delmonte P, Yurawecz MP, Rader JL. Official methods for the determination of *trans* fat. Champaign: AOCS press 2003.
23. Carpenter DM, Ngeh-Ngwainbi J, Lee S. Lipid Analysis. In: Carpenter DE, Sullivan DM. Methods of analysis for nutritional labeling. Arlington: AOAC International 1993 p 85-104.
24. Antoniassi R, Lago RCA. Lipid Extraction from different Matrices. In: International workshop on fats, oils and oilseed analysis. Rio de Janeiro: IUPAC 2000. p.160-8.
25. Lago RC, Piombo G, Antoniassi R. Lipid extraction from different matrices. In: IUPAC/AOCS Workshop on fats oils and oilseeds, analysis and production. Tunis, Tunísia. 6-8 dez. Conferência. 2004.
26. Aued-Pimentel S, Kus MMM, Kumagai EE, Ruvieri V, Zenebon O. Comparison of gas chromatographic and gravimetric methods for quantization of total fat and fatty acids in foodstuffs. *Química Nova* (no prelo, on-line).
27. Kus MMM, Aued-Pimentel S, Mancini-Filho J. Comparação de metodologias analíticas para a determinação de lipídios e ácidos graxos poli-insaturados por cromatografia gasosa em fórmula infantil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009; 68 (1):12-20.
28. Lobanco CM, Vedovato GM, Cano C, Bastos DHM. Fidedignidade de rótulos de alimentos comercializados no município de São Paulo, SP *Rev Saúde Pública* 2009; 43:499-505.
29. Lutheia DL. Oil extraction and analysis. Critical issues and comparative studies, Champaign (IL): AOCS press 2004.
30. Report of the AOAC International task forces on methods for nutrient labeling analysis. *J AOAC*. 1993; 76:180A-201A.
31. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.
32. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959; 37:911-7.

33. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
34. Christie WW. The lipid library. 2006 [Acesso em: 11 nov. 2006] Disponível em: <http://www.lipidlibrary.co.uk/infores/lipids.htm>.
35. Pérez-Palacio T, Ruiz J, Martín D, Murial E, Antequera T. Comparison of different methods for total lipid quantification in meat and meat products. *Food Chemistry*. 2008; 110: 1025-9.
36. Iverson SJ, Lang SLC, Cooper MH. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*. 2001; 36:1283 -7.
37. Ametaj BN, Bobe G, Lu Y, Young JW, Beitz DC. Effect of sample preparation, length of time and sample size on quantification of total lipids from bovine liver. *J Agric Food Chem*. 2003; 51:2105- 10.
38. Ngeh-Ngwainbi J, Lin J, Chandler A. Determination of total, saturated, unsaturated, and monounsaturated fats in cereal products by acid hydrolysis and capillary gas chromatography: collaborative study. *J AOAC Int*. 1997; 80:359-72.
39. House SD, Larson PA, Johnson RR, DeVries JW, Martin DL. Gas chromatographic determination of total fat extracted from food samples using hydrolysis in the presence of antioxidants. *JAOAC Int*. 1994; 77:960-5.
40. House SD. Determination of total, saturated and monounsaturated fats in foodstuffs by hydrolytic extraction and gas chromatographic quantitation: collaborative study. *JAOAC Int* .1997; 80:555-563.
41. Carrapiso AI, Garcia C. Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in *situ* transesterification. *Lipids*. 2000; 35:1167-77.
42. Christie WW. Preparation of esters derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: *Advances in lipid methodology – two*. 1993 p.69-111. [Acesso em: 05 out.2004]. Disponível em: <http://www.lipid.co.uk/infores/topics/methests/index.htm>.
43. Kramer JKG, Fellner V, Dugan MER, Sauer FD, Massoba MM, Yurawecz MP. Evaluating acid and base catalysis in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total *trans* fatty acids. *Lipids* 1997 32:1220-8.
44. Aued-Pimentel S, Lago JHG, Chaves MH, Kumagai EE. Evaluation of a methylation procedure to determine cyclopropenoids fatty acids from *Sterculia striata* st. *Hil. et Nauds* seed oil. *J Chromatogr A*. 2004; 1054: 235-9.
45. Ratnayake WMN. Overview of methods for the determination of *trans* fatty acids by gas chromatography, silver-ion thin layer chromatography, silver-ion liquid chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *JAOAC Int*. 2004; 87: 523-39.
46. Aued-Pimentel S, Kumagai EE, Kus MMM, Caruso MSF, Tavares M, Zenebon O. Ácidos graxos *trans* em óleos vegetais poli-insaturados refinados comercializados no Estado de São Paulo, Brasil. *Ciênc Tecnol Alim* 2009 29:646-51.
47. Milinsk MC, Matsushita M, Visentainer JV, Oliveira CC, Souza NE. Comparative Analysis of Eight Esterification Methods in the Quantitative Determination of Vegetable Oil Fatty Acid Methyl Esters (FAME) *J Braz Chem Soc*. 2008; 19:1475-83.
48. Aued-Pimentel S, Caruso MSF, Kumagai EE, Ruvieri V, Zenebon O. Ácidos graxos saturados em produtos alimentícios: comparação de procedimentos na análise por cromatografia em fase gasosa. *Rev Inst Adolfo Lutz* .2005; 64:167-72.
49. Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Prac*. 1973; 22: 475-6.
50. Golay PA, Dionisi F, Hug B, Giuffrida F, Destailats F. Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on *trans* fatty acid content. *Food Chemistry*. 2006; 101:1115-20.
51. Mazalli MR, Bragagnolo N. Validation of two methods for fatty acids analysis in eggs. *Lipids*. 2007; 55:2743-8.
52. Official methods and recommended practices of the AOCS. 5<sup>th</sup> ed, Champaign (IL): AOCS. Additions and revisions 2007-2008. Method Ce 1k-07, Method Ce 1j-07
53. ISO - International Organization for Standardization. Animal and vegetable fats and oils Preparation of methyl ester of fatty acids (ISO 5508). Switzerland: ISO;1990.
54. James AT, Martin AJP Gas liquid partition chromatography: the separation and micro estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochem J*. 1952; 50:679-90.
55. Lanças FM. Cromatografia em fase gasosa. São Paulo: Acta;1993.
56. Mc Cance, Widdowson's editors. The composition of food. 6<sup>th</sup>ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry 2002.
57. Weihrauch JL, Posati LP, Anderson BA, Exler, J. Lipid conversion factors for calculating fatty acids contents of foods. *J Am Oil Chem Soc*. 1977; 54:36-40.
58. Posati LP, Kinsella JE, Watt BK. Comprehensive evaluation of fatty acids in food. III. Egg and egg products. *J Am Diet Assoc*. 1975 67:111-5.
59. International Organization for Standardization – ISO. Animal and vegetable fats and oils. Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids (ISO 5509E). Switzerland: ISO 1978.
60. International Organization for Standardization – ISO. Animal and vegetable fats and oils. Determination of the content of trans fatty acid isomers of vegetable fats and oils. Gas chromatographic method (ISO15304(E)). 2 ed. Switzerland: ISO 2002.
61. Official methods and recommended practices of the AOCS. 5<sup>th</sup> ed, Champaign (IL): AOCS. Additions and revisions 1999-2006. Method Ce 1h-05. Method Cd 14d 99. Method Cd 14-95.
62. Ackman RG, Sipos JC. Application of specific response factors in the gas chromatographic analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detector. *J Am Oil Chem Soc*. 1964; 41:377-8.
63. Bannon CD, Graske JD, Hillker AE. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability V. Validation of theoretical relative response factors of unsaturated esters in the flame ionization detector. *J Am Oil Chem Soc*. 1986; 63:105-10.
64. Schreiner M. Quantification of long chain polyunsaturated fatty acids by gas chromatography. Evaluation of factors affecting accuracy. *J Chromatogr A*. 2005; 1095:126-30.
65. Mosoba M, Kramer J. Official Methods for Determination of *Trans* fat. 2nd ed, Champaign: AOCS press 2009.
66. Kodali DR, List GR. *Trans* fat alternatives. Champaign: AOCS press; 2005.
67. Miyake Y, Yokomizo K. Determination of cis- and trans-18:1 fatty acid isomers in hydrogenated vegetable oils by high-resolution carbon nuclear magnetic resonance. *J Am Oil Chem Soc*. 1998; 75: 801-5.
68. Cruz-Hernandez C, Deng Z, Zhou J, Hill AR, Yurawecz MP, Delmonte P, Mossoba MM, Dugan MER, Kramer JKG. Methods for analysis of conjugated linoleic acids and *trans*-18:1 isomers in dairy fats by using a combination of gas chromatography, silver-ion thin layer chromatography/gas chromatography, and silver-ion liquid chromatography. *JAOAC Int*. 2004; 87: 545-62.

69. Ratnayake WMN, Plouffe LJ, Pasquier E, Gagnon C. Temperature sensitive resolution of partially hydrogenated vegetable oils on SP-2560 and SP-Sil 88 capillary columns. *JAOAC Int.* 2002; 85:1112-8.
70. Ratnayake WMN, Hansen SL, Kennedy MP. Evaluation of the CP-Sil 88 and SP-2560 GC columns used in the recently approved AOCS official method Ce 1h-05: determination of *cis-trans* -,saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in vegetable or non-ruminant animal oils and fats by capillary GLC method. *J Am Oil Chem Soc.* 2006; 83:475-88.
71. Ceriani R, Meirelles AJA. Formation of *trans* PUFA during deodorization of canola oil: a study through computational simulation. *Chem Eng Proc.* 2007; 46:775-85.
72. Buchgraber M, Ulberth F. Determination of low level *trans* unsaturation in physically refined vegetable oils by capillary GLC - results of 3 intercomparison studies. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2002; 104: 792-99.
73. Kramer JKG, Blackadar CB, Zhou J. Evaluation of two GC columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100 m CP-Sil 88) for analysis of milkfat with emphasis on CLA, 18:1, C18:2 and C18:3 isomers, and short- and long-chain FA. *Lipids.* 2002; 37: 823-35.
74. Destailats F, Golay PA, Joffre F, Wispelaere M, Hug B, Giuffrida F et al. Comparison of available analytical methods to measure *trans*-octadecenoic acid isomeric profile and content by gas-liquid chromatography in milk fat. *J Chromatogr A.* 2007;1145:222-8.
75. Vlaeminck B, Harynuk J, Fievez V, Marriott P. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for the separation of fatty acids in milk. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2007; 109: 757-66.
76. Ali LH, Angyal G, Weaker CM, Rader JI. Comparison of capillary column gas chromatographic and AOAC gravimetric procedures for total fat and distribution of fatty acids in food. *Food Chemistry.* 1997; 58:149-160.
77. Rader JI, Anguila G, O'Dell RG, Weaver CM, Sheppard AJ, Bueno P. Determination of total fat and saturated fat in foods by packed column gas-liquid chromatography after acid hydrolysis. *Food Chemistry.* 1995; 54:419-27.
78. Satchithanandam S, Fritsche J, Rader JI. Extension of AOAC Official Method 996.01 to the analysis of standard reference material (SRM) 1846 and infant formulas. *JAOAC Int.* 2001; 84:805-14.
79. Satchithanandam S, Fritsche J, Rader JI. Gas chromatographic analysis of infant formulas for total fatty acids, including *trans* fatty acids. *J AOAC Int.* 2002; 85:86-94.
80. Satchithanandam S, Carolyn J, Oles Spease CJ, Brandt MM, Yurawecz MP, Rader JI. *Trans*, Saturated, and Unsaturated Fat in Foods in the United States Prior to Mandatory *Trans*-Fat Labeling. *Lipids.* 2004; 39:11-8.
81. De Vries JW, Kjos L, Grof L, Martin B, Cernohous K, Patel H et al. Studies in improvement of Official Method 996.06. *JAOAC Int.*1999; 82:1146-55.
82. Rozena B, Mitchell B, Winters D, Kohn A, Sullivan D, Meinholz E. Proposed modifications to AOAC 996.06, optimizing the determination of *trans* fatty acids: presentation of data. *JAOAC Int.* 2008; 92: 92-7.
83. *Codex Alimentarius* Commission. Report of the the twenty eighth session of the *Codex* Committee on methods of analysis and sampling. Budapest, Hungary. 5-9 March, 2007.